体外診断用医薬品
製品番号 6603859

**2009 年 11 月改訂
*2004 年 10 月改訂
承認番号 20300AMY00145000

日本標準商品分類番号
877449

B 細胞キット
サイトスタット／コールタークローン
B4-FITC

ご使用に際しては、本添付文書をよくお読みください。

全般的な注意

1. 本品は、体外診断用でありそれ以外の目的に使用しないでください。
2. 診断は他の関連する検査結果や臨床症状等に基づいて総合的に判断してください。
3. 添付文書等に記載した内容以外の方法で使用した場合には、保証しません。
4. ご使用にあたっては、測定装置の取扱説明書をよく読んでから使用してください。

形状・構造等（キットの構成）

本品は、FITC（Fluorescein isothyocyanate）で標識したモノクローナル抗体の混合試薬（溶液）です。1テストあたり以下の抗体タンパクを含有しています。

B4-FITC　：　0.2～1.2μg/テスト

対象抗原：
B4：CD19（分子量 95kD）
CD19 抗原は分化段階の初期からみられる系統特異的な”pan-B 細胞”表面抗原で、通常は B 細胞分化段階の最も早期の B 前駆細胞で発現し、分化段階の終末である形質細胞で消失するまで発現が持続します。末梢血、脾臓、リンパ節、扁桃から分離した B 細胞の 90%以上、及び骨髄細胞の約 5%に発現します。CD19 抗原の造血系における発現は、B 細胞系統に限られ、末梢血の T 細胞、単球、顆粒球、血小板には検出されません。

クローン：
B4：89B（CD19）
B 細胞性慢性リンパ球性白血病患者の腫瘍細胞で免疫した BALB/cJ マウスの脾臓細胞とマウス NS/1-AG4 ミエローマ細胞の融合細胞から分離

Ig 構造：
マウス IgG1 H 鎖及びκL 鎖

細胞毒性：
なし

原料及び精製法：
腹水または培養上清よりイオン交換クロマトグラフィまたはアフィニティクロマトグラフィで精製

標識：

B4-FITC：FITC (Fluorescein isothyocyanate)

FITC／抗体タンパク比	:5～10
励起波長	:468～509nm
蛍光波長	:504～541nm

試薬濃度：
1 バイアル 0.5mL 中の抗体以外の各種成分の濃度

BSA	: 0.2%
リン酸カリウム	: 0.01M
NaCl	: 0.15M
NaN_3	: 0.1%
スタビライザ	

使用目的

リンパ球表面抗原の分析及び B 細胞の検出
全血中の B 細胞の測定

測定原理

測定方法は、フローサイトメトリーを用いた 2 カラー直接免疫蛍光法です。すなわち、本品を B 細胞上の CD19 抗原に反応させ、細胞に波長 488nm の励起光を照射して緑色蛍光（FITC）を発光させ、それぞれの蛍光を光電子増倍管で増幅し、その電気信号をコンピュータで解析、表示させることにより各抗体陽性細胞の計測を行います。

測定には 4 チャンネル以上の検出器のあるフローサイトメーターを用います。前方散乱光（FS）と側方（90°方向）散乱光（SS）によるスキャッターサイトグラム中のリンパ球領域にゲートをかけることにより、自動的にリンパ球のみを計測し、蛍光強度の解析ができます。また、解析細胞数も数千個と多いため、高精度で再現性の良い結果が得られます。

操作上の注意

1. 本品はフローサイトメトリー専用試薬ですので、蛍光顕微鏡には用いないでください。
2. 本品は全血検体用に調製されています。新鮮または凍結保存した分離単核球検体への使用は不適当です。
3. 抗凝固剤としては、EDTA、ヘパリン等を用いることができますが、いずれの場合でも採血後は室温で保存し、6 時間以内に染色することをお勧めします。特に白血病細胞等では、保存によって急激に陽性率の低下を来す場合があるので注意してください。
4. 静脈血検体の場合、細胞のバイアビリティ（生存率）は 90%以上が理想的ですが、異常検体ではこれを下回ることがあります。
5. 溶血不良となるおそれがあるため、検体を試験管に分注する際は試験管の口や壁面に検体を付けないよう注意してください。付着した血液は、綿棒等で取り除きます。
6. 病態と特定の白血球ポピュレーションの変動とは必ずしも一致しないため、測定結果は臨床及び他の診断上データと共に使用します。
7. 有核赤血球、蛋白濃度が異常な場合、ヘモグロビン合成異常では、赤血球の溶血が不完全となる場合があります。この場合、溶血していない赤血球をリンパ球としてカウントするために陽性率が実際よりも低くなるおそれがあるので注意してください。
8. 溶血時間が長すぎると白血球も影響を受けることがあります。
9. サンプルの前処理をイムノプレップで行う場合は、遠心洗浄の操作は不要です。サンプル自動調製システム TQ-Prep（または Multi-Q-Prep）を用いることにより、サンプル処理が短時間で簡単にできます。
10. フローサイトメーターのレーザ光軸の設定不良や不適切なゲート設定により、誤った結果が得られる場合があります。
11. B 細胞に反応するモノクローナル抗体を用いて得られた B 細胞数は、細胞表面免疫グロブリン陽性細胞の数と異なる場合があります。全身性エリテマトーデスなど、血漿中の IgG 量が高い場合に、細胞表面免疫グロブリン陽性細胞数が異常な高値を示すことがあります。
12. 測定結果の解釈を行う場合には、測定条件及び供血者の年令、性別、喫煙習慣等の影響も考慮します。

用法・用量（操作方法）

【試薬の調製】

モノクローナル抗体試薬はそのまま使用します（1テストあたり 10μL）。

【その他必要な試薬】

1. TQ-Prep（または Multi-Q-Prep）を用いてサンプルの処理を行う場合

   イムノプレップ（専用試薬；別売）
   製品番号 7546999　容量 300 テスト（TQ-Prep、Multi-Q-Prep 用）

   イムノプレップは以下の 3 つの試薬で構成されます。

   ①イムノプレップ A（溶血剤）
   ②イムノプレップ B（反応停止剤）
   ③イムノプレップ C（固定剤）

2. コールター全血法でサンプルの処理を行う場合

   1）コールター全血ライジングキット（別売）

   製品番号 6603152　容量 300 テスト
   イムノライズ*1mL に PBS（下記）24mL を加えます。

フィクサティブ**はそのまま使用します。

*イムノライズ：キット中の溶血試薬
**フィクサティブ：キット中の固定剤
（医薬用外劇物：9.25%のホルムアルデヒドを含有するため、取り扱いには十分注意してください。）

2）PBS（リン酸緩衝生理食塩水）

PBS バッファ（製品番号 6603369）1 パックを蒸留水 500mL に溶解します。調整後のpH は 7.2±0.2 で、防腐剤等は含んでいません。

3. コントロール試薬（アイソタイプ・コントロール抗体）

サイトスタット／コールタークローン MslgG1-FITC（B4-FITC 用）
製品番号 6603864　容量 50 テスト（0.5mL）

【検体の採取の調整】

検体には EDTA、ヘパリン等の抗凝固剤を用いて採血した末梢血を用います。試験管 1 本につき 100μLの血液を用いるため、テスト及び対照と検体希釈のための自家血漿採取用として、1 検体につき 1～2mL の血液が必要となります。

染色に最適な白血球数の範囲は 3～10×10^3 個/mm^3 であるため、白血球数が 10×10^3 個/mm^3 を超える場合は検体を希釈します。逆に 3×10^3 個/mm^3 より少ない場合は遠心して再浮遊させます。Q-Prep／イムノプレップ試薬システムを用いて赤血球を溶血する場合は、同一患者の血漿で検体を希釈します。それ以外の溶血試薬を用いる場合にはリン酸緩衝生理食塩水（PBS）で希釈します。

注）検体は採血後室温（20～25℃）で保存してください。採血後 6 時間以内に操作を開始することをお勧めします。

【細胞数の調製】

a）白血球数が多い検体の場合（＞10×10^3 個/mm^3）

白血球数			希釈倍数
10～20	×10^3	:	2 倍
20～30	×10^3	:	3 倍
30～40	×10^3	:	5 倍
40～60	×10^3	:	6 倍
60～100	×10^3	:	10 倍
100～200	×10^3	:	20 倍

b）白血球数が少ない検体の場合（＜3×10^3 個/mm^3）

バフィーコート法
（1）検体を 25℃で 500×g、5 分間遠心します。
（2）白血球の層をパスツールピペットで採取します。この際、すべての白血球を確実に回収するため赤血球及び血漿も一部回収します。
（3）数回ピペッティングして、十分に懸濁させます。
（4）コールターLH700 シリーズ等のヘマトロジーアナライザーや血球計算板を用いて細胞濃度を測定します。
（5）細胞濃度を 10×10^3 個/mm^3 に調整します。1テストあたり 100μL を用い、以下の操作手順に従って処理します。

【操作方法】

1. イムノプレップ（別売：弊社までお問い合せください）を用いる場合（Q-Prep 法）

イムノプレップは、TQ-Prep（または Multi-Q-Prep）*用に Coulter Immunology が開発した溶血試薬キットで、以下の 3 つの試薬で構成されます。

①イムノプレップ A（溶血剤）
②イムノプレップ B（反応停止剤）
③イムノプレップ C（固定剤）

*TQ-Prep（または Multi-Q-Prep）：フローサイトメトリー用の多検体サンプル自動調製システム。イムノプレップを組み込み、一定時間ごとに溶血剤、反応停止剤、固定剤を試験管に自動的に分注、撹拌することにより、一度に多検体のサンプル自動処理ができます。

1）モノクローナル抗体反応用と対照用に 12mmφ×75mm の試験管を用意します。
2）それぞれの試験管に全血 100μL を分注します。管壁に付着した血液は綿棒等で拭き取ります。
3）モノクローナル抗体試薬 10μL を反応用の試験管に加えます。対照用の試験管にはコントロール試薬（サイトスタット／コールタークローン MSlgG1-FITC、別売）を 10μL 加えます。
4）よく撹拌した後、室温で 10～12 分間反応させます。
5）試験管を TQ-Prep（または Multi-Q-Prep）で溶血・固定処理します。
6）25～35 分室温放置した後 EPICS フローサイトメーターを用いてリンパ球領域の蛍光陽性率を測定します。
7）調製したサンプルは、室温で 2 時間まで保存できます。2 時間を超えるときは、2～8℃で遮光保存します。調製後 24 時間以内に測定してください。

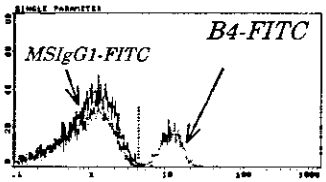
2. コールター全血ライジングキットを用いる場合（コールター全血法）

1）モノクローナル抗体反応用と対照用に試験管を用意します。
2）それぞれの試験管に全血 100μL を分注します。管壁に付着した血液は綿棒等で拭き取ります。
3）モノクローナル抗体試薬 10μL を反応用の試験管に加えます。対照用の試験管にはコントロール試薬（サイトスタット／コールタークローン MSlgG1-FITC、別売）を 10μL 加えます。
4）よく撹拌した後、室温で 45 分間反応させます。
5）PBS を 2～3mL 加えて撹拌させ、400～450×g、5 分間遠心分離します。
6）上清を吸引除去します。
7）溶血剤（キット中の「イムノライズ」を PBS で 25 倍希釈）を 1mL 加えてよく撹拌させ、30 秒～2 分間室温で放置します。
8）溶血が完了（サンプルの透明度が増す）したら、直ちにキット添付の「フィクサティブ」を 250μL 加え、撹拌します。
9）PBS を 2mL 加え、再度撹拌します。
10）400～450×g、5 分間遠心分離します。
11）上清を吸引除去します。
12）9）～11）の操作を繰り返します。
13）PBS を 500μL 加え、よく撹拌します。
14）以上の処理を行った後、EPICS 等のフローサイトメーターを用いてリンパ球領域の蛍光陽性率を測定します。検体はアイスバス中で遮光保存し、速やかに測定を行います。

測定結果の判定方法

1. 正しく調整し、適切にゲートをかけたフローサイトメーターを用いて細胞を測定します。
2. Q-Prep 法で処理した検体を、EPICS フローサイトメーター以外の装置（FS を狭角で検出するようなフローサイトメーター）で測定する場合には、Q-Prep 法で処理した後に、イオン交換水または蒸留水 0.5mL を試験管に加えます。明瞭な三分画（リンパ球、単球、顆粒球領域）が得られるようにスレッショルドと散乱光のゲインを調整します。
3. リンパ球領域に解析ゲートを設定し、FITC 蛍光（Log スケール）の 1 パラメータ蛍光ヒストグラムを取得します。
コントロール試薬を対照として設定されたカーソルの右側部分が、CD19 陽性細胞となります。

図 1. ヒストグラム例（Q-Prep 法、遠心洗浄なし）



絶対数の計算

CD19 陽性細胞の絶対数は、Flow-Count（絶対数測定用試薬、別売）を併用して簡便かつ高精度に測定できます。また、各サブセットの陽性率と血球数算定（コールターLH700 シリーズ等による）の結果から次式により計算することもできます。

絶対数（個/mm^3）＝
総白血球数（個/mm^3）×リンパ球%×陽性率%／10^4）

【測定条件の確認】

測定条件が正しいかどうかを確認するには、CYTO-TROL（精度管理用陽性コントロール細胞、製品番号 6604248）または健常者検体を陽性コントロールとします。正常値は施設ごとに設定してください。

Fc レセプタを介した単球、顆粒球に対する非特異結合はリンパ球領域を正しくゲーティングすることで除外できます。検体ごとにサイトスタット／

コールタークローン Mo2-RD1/KC56-FITC（CD14/CD45）を測定すると、単球を含まない正しいリンパ球領域のゲーティングが可能となります。

検体ごとに抗体の非特異的な Fc 結合を確認するため適切なアイソタイプ・コントロール試薬（サイトスタット／コールタークローン MSIgG1-FITC）を用います。健常者検体の場合、コントロール試薬の陽性率は通常 1～2%となります（2%を上回る場合、測定結果は誤差を含んでいるおそれがある）が、腫瘍検体ではより高い値を示すことがあります。

臨床的意義

免疫機構の機能的中心であるリンパ球のうち、T 細胞は骨髄中の幹細胞を起源とし、胸腺における機能的成熟過程を経て末梢血、組織に現れます。T 細胞はその分化成熟段階に、あるいは機能的サブセットに特有の細胞表面抗原を有しています。コールタークローン モノクローナル抗体はこのような細胞表面抗原を検出することによって免疫機構をさらに詳しく解明する目的で、Harvard Medical School の Dr. S.F. Schlossman の研究グループと Coulter Immunology によって共同開発されました。

ヒト末梢血のリンパ球ポピュレーションは T 細胞（胸腺由来）、B細胞（骨髄細胞）、ヌル細胞の 3 つの細胞タイプから成ります。これらの細胞タイプは顕微鏡検査では形態学的に区別できませんが、細胞膜上の特有な抗原の違いによって同定が可能です。

“Pan-T 細胞”抗原及び”Pan-B 細胞”抗原に特異的なモノクローナル抗体は、それぞれ成熟 T 細胞及び B 細胞の同定・算定に用いることができます。また、リンパ球の成熟（分化）段階や機能的分類は、特定の細胞表面抗原に特異的なモノクローナル抗体を用いて確定することができます。本品は、”pan-B 細胞”抗原である CD19 にそれぞれ特異的に結合する B4 モノクローナル抗体によって、末梢血の B 細胞数を測定します。

蛍光抗体法によりリンパ球の分類を行う場合、通常は比重遠心分離あるいは溶血処理により赤血球を除去し、リンパ球分画を回収しています。いずれの方法とも混入した分離液や溶血剤あるいは未反応の抗体を除去するため、撹拌～遠心分離～アスピレーションの操作を繰り返す必要があります。この一連の操作の繰り返しにより、腫瘍細胞や活性化細胞がダメージを受けるおそれがあります。また、アスピレーション操作による細胞の流失も生じます。この問題を解決するため、遠心分離～アスピレーション操作のいらない検体処理法（No Wash法）が考案され、全血サンプルを No Wash 法で処理する自動前処理システムとして Q-Prep 及び TQ-Prep が開発されています。サイトスタット／コールタークローンはバックグラウンドの蛍光が低く、Q-Prep または TQ-Prep による前処理に最適なリンパ球サブセット分析用モノクローナル抗体試薬です。

B 細胞の割合（陽性率）と陽性細胞数（絶対数）は、既知あるいは未知の疾病下にある患者の免疫機能の評価や、臓器移植後のリンパ球レベルのモニタに有用です。

すなわち、T 細胞及び B 細胞数の異常は、白血球数の減少を来している未知の疾患の患者の診断及び予後判定に役立ちます。T 細胞及び B 細胞の分析は、CD4 陽性（インデューサー）T 細胞、CD8 陽性（サプレッサー／細胞障害性）T 細胞、及び CD4/CD8 比と組み合せることで、後天性免疫不全症候群（AIDS）の病原体であるヒト免疫不全ウイルス（HIV）の感染のような免疫不全症の診断や予後判定にも有用です。T 細胞及び B 細胞の陽性率の変動は、腎、心、肝、肺などの臓器移植に伴って認められ、T 細胞及び CD4 陽性リンパ球数の測定がこれらの細胞集団のモニタリングに有用であることが示唆されます。

性能

【期待値】

自社施設にて、21～95 歳の健常者男女の末梢血（n=30）を本品で測定して得られた B4 陽性率の期待値範囲は 5～15%でした。
これはあくまでも期待値の一例であり、施設ごとに期待値を設定してください。

【特異性】

B4 モノクローナル抗体は、白血球分化抗原に関する国際ワークショップにおいて CD19 抗体として認定されています。

健常者末梢血では、本品はリンパ球に反応しますが、単球及び顆粒球とは反応しません。また、本品の交差反応性は、健常成人の全血検体でも調べられており、CD19 陽性リンパ球集団に特異的に反応することが確かめられています。

【同時再現性】

本品で、健常者末梢血を 3 回以上繰り返し測定したとき、陽性率の変動係数（%CV）は 10%以下です。

使用上または取扱上の注意

1. 本品はアジ化ナトリウムを 0.1%含んでいます。アジ化ナトリウムは酸性下で有毒なアジ化水素酸を産生するので、取り扱いには十分注意してください。また、アジ化物が金属性の排水管内に蓄積することによる爆発の危険性を避けるため、アジ化物の廃棄は多量の流水で希釈して行ってください。
2. 有効期限を過ぎた試薬を使用しないでください。
3. 検体及び検体に触れた器具類は感染の危険性があるものとして取り扱い、適切な表示及び処理をした後に廃棄してください。
4. ピペットを口で吸引しないでください。皮膚や粘膜への検体の接触を避けてください。
5. 保管及びインキュベーション中に試薬を強い光にさらさないでください。
6. 試薬が微生物に汚染されないよう注意してください。

貯法、有効期限、安定性

1. 本品は、未開封、冷蔵（2～8℃）で保存した場合に各バイアルに明記してある有効期限まで使用できます。
2. 本品を凍結したり、長時間光にさらすことは避けてください。すべての試薬は使用する前に室温（20～25℃）に戻してください。
3. 試薬の外観に変化が見られたり、コントロール検体による測定値に大きな変化がある場合は、試薬の劣化が考えられるので使用しないでください。試薬の正常な外観は、淡黄色がかった透明な液体です。

包装単位

サイトスタット／コールタークローン B4-FITC
製品番号 6603859　　容量 50 テスト（0.5mL）

主要文献

1. McMichael A.J. ed: 1987. Leukocyte Typing III. Oxford: Oxford University Press, p.38-40, 42, 106-107, 116, 199, 302-306, 308, 315, 475.
2. Reinherz EL and Schlossman SF: 1980. The differentiation and function of human T lymphocytes. Cell: 821-827.
3. Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM and Bernstein ID: 1986. Leukocyte Typing II. New York: Springer-Verlag. Vol. 2, p.8, 15-25, 37.
4. Drexler HG, Gignac SM and Minowada J: 1988. Routine immunophenotyping of acute leukemias. Bult 57: 327-339.
5. Nadler LM, Anderson KC, Marti G, Bates M, Park E, Daley JF and Scholossman SF: 1983. B4, a human B lymphocyte-associated antigen expressed on normal, mitogen-activated, and malignant B lymphocytes. J Immunol 131: 244-250.
6. Benjamini E and Leskowitz S: 1991. Disorders of the Immune Response. In: Immunology: A Short Course. Second Edition. New York: Wiley-Liss. p.211-244.
7. Reinherz EL, O'Brien C, Rosenthal P and Schlossman SF: 1980. The cellular basis for viral-induced immunodeficiency: Analysis by monoclonal antibodies. J Immunol 125: 1269-1274.
8. Felsenstein D, Camey WP, lacoviello VR and Hirsch MS: 1985. Phenotypic properties of atypical lymphocytes in cytomegalo-virus-induced mononucleosis. J Infect Dis 152: 198-203
9. Rinaldo CR, Ho M, Hamoudi WH, Gui X and DeBiasio RL: 1983. Lymphocyte subsets and natural killer cell responses during cytomegalovirus mononucleosis. Infect Immun 40: 472-477.
10. Schmidt RE: 1989. Monoclonal antibodies for diagnosis of immunodeficiencies. Blut 59: 200-206
11. de Martini RM and Parker JW: 1989. Immunologic alterations in human immunodeficiency virus infection: A review. J Clin Lab Anal 3: 56-70.
12. Fauci AS: 1988. The human deficiency virus: Infectivity and mechanism of pathogenesis. Science 239: 617-622.
13. Pedrazzini A, Freedman AS, Andersen J, Heflin L, Anderson K, Takvorian T, Canellos GP, Whitman J, Coral F, Ritz J and Nadler LM: 1989. Anti-B cell monoclonal antibody purged autologous bone marrow transpiantation for B-cell non-Hodgkin's lymphoma: Phenotypic reconstitution and B-cell function: Blood 74: 2203-2211.
14. Ramos EL, Turka LA, Leggat JE, Wood IG, Milford EL and Carpenter CB: 1989. Decrease in phenotypically defined T helper inducer cells (T4+4B4+) and increase in T suppressor effector cells (T8+2H4+) in stable renal allograft recipients. Transplantation 47: 465-471.
15. Koepke JA and Landay AL: 1989. Precision and accuracy of absolute lymphocyte counts. Clin Immunol Immunopathol 52: 19-27.

**問い合わせ先

ベックマン･コールター株式会社

〒135-0063 東京都江東区有明三丁目５番７号 TOC 有明ウエストタワー

TEL： 0120-566-730　 FAX： 03-5530-2460

**製造販売元

ベックマン･コールター株式会社

〒135-0063 東京都江東区有明三丁目５番７号 TOC 有明ウエストタワー